Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Chromatographische, elektrophoretische und enzymkinetische Untersuchungen eines IgA-Amylase-Komplexes (Makroamylase)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
KLAUS WIRTH
aus Bad Mergentheim

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547613_0023

Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Chromatographische, elektrophoretische und enzymkinetische Untersuchungen eines IgA-Amylase-Komplexes (Makroamylase)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
KLAUS WIRTH
aus Bad Mergentheim

1983

Dekan:	Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Eggstein
2. Berichterstatter:	Professor Dr. P. Berg

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

INHALTSVERZEICHNIS

Seite:

1. Einleitung 1
   1.1. Fallbericht und Fragestellungen 2

2. Material und Methoden 5
   2.1. Material 5
      2.1.1. Untersuchungsgut 5
      2.1.2. Chemikalien 5
      2.1.3. Geräte 6
      2.1.4. Bestimmung der Amylaseaktivität 7
         2.1.4.1. Kinetische UV-Methode zur alpha-Amylase-Bestimmung 7
         2.1.4.2. Amyloklastische Methode 8
   2.2. Methoden 10
      2.2.1. Ausschlußchromatographie zur Differenzierung von Amylase und Makroamylase 10
      2.2.2. Dissoziation von Makroamylase in Abhängigkeit vom pH-Wert 12
      2.2.3. Agarosegel-Elektrophorese 12
         a) Vorbereitung der Proben 13
         b) Herstellung des Trägermediums 13
         c) Auftragstechnik 13
         d) Durchführung der Isoamylasen-Elektrophorese 14
         e) Darstellung der Isoamylasemuster 14
      2.2.4. Michaelis-Konstanten (Km-Werte) 14

3. Ergebnisse 17
   3.1. Ausschlußchromatographie zur Differenzierung von Makroamylase und Amylase 17
   3.2. Dissoziationsverhalten der Makroamylase in Abhängigkeit vom pH-Milieu 19

UNIV. LEIDEN MED.

Seite:

3.3. Agarosegelelektrophorese 23
3.4. Michaelis-Konstanten (Km-Werte) 28

4. Diskussion 31
4.1. Ausschlußchromatographie 31
4.2. Dissoziationsverhalten und Natur der Makroamylase 31
4.3. Agarosegelelektrophorese 32
4.4. Kinetik 34
4.5. Ätiologie der Makroamylasämie 35

5. Zusammenfassung 40

6. Literaturverzeichnis 41

1. Einleitung

Eine Hyperamylasämie ohne Hinweis auf eine Speicheldrüsen-, Pankreas- oder Nierenerkrankung läßt an eine Makroamylasämie denken. Bei der Makroamylasämie sind statt der normalen Amylase mit einem Molekulargewicht von rund 45 000 (7) Amylasekomplexe in einer Größenordnung von 160 000 bis 1 000 000 nachweisbar (1, 18, 19, 23). Infolge ihrer Größe können diese Moleküle nicht über die Nieren ausgeschieden werden; die Amylaseclearance ist vermindert. Im Gegensatz zur reduzierten Amylaseclearance bei einer Niereninsuffizienz ist die Kreatininclearance in diesen Fällen als Ausdruck einer intakten Nierenfunktion nicht beeinträchtigt (9, 10). Ein weiteres typisches Kennzeichen ist die Persistenz der erhöhten Serumamylasewerte über ein längeres Beobachtungsintervall.
Mit Hilfe der Säulenchromatographie auf Sephadex G 100 wiesen WILDING et al. 1964 als erste großmolekulare Amylasekomplexe im Serum eines Patienten mit persistierender Hyperamylasämie nach. BERK et al. prägten 1967 den Begriff "Makroamylasämie". Wegen des unterschiedlichen Molekulargewichts von Amylase und Makroamylase können beide Enzymformen mit Hilfe der Ausschlußchromatographie unterschieden werden. Amylasekomplexe können unterschiedlicher Natur sein. BERK et al. fassen folgende Möglichkeiten zusammen:

1) Amylasemoleküle bilden Komplexe mit Serumproteinen
   a) mit Immunglobulinen
   b) mit sonstigen Serumproteinen

2) Mehrere Amylasemoleküle polymerisieren (Aggregation)

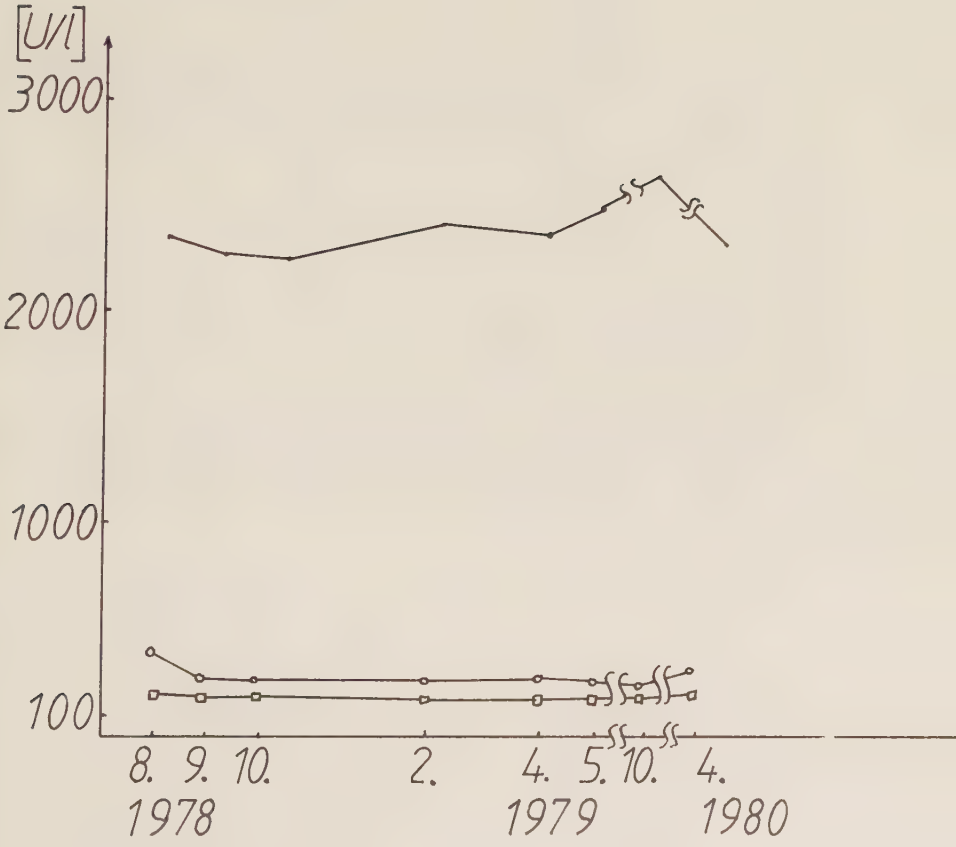
3) Amylase wird von Kohlenhydraten gebunden
   a) von Glykogen (endogen)
   b) von Hydroxyäthylstärke (exogen)

1.1. Fallbericht und Fragestellungen

An der medizinischen Universitätsklinik Tübingen wurde 1978 ein Fall von Makroamylasämie diagnostiziert (5). Seit 1975 ist bei der Patientin Lui. R. (geb. 12.5.23, Pat. Nr. 127222/78) ein insulinpflichtiger Diabetes mellitus bekannt. Sie wurde zur Neueinstellung ihres Diabetes und wegen massiv erhöhter Serumamylasewerte (2000 - 2600 U/l) in die Klinik eingewiesen. Dagegen lagen Serumlipase und Urinamylase im Normbereich. Auch die harnpflichtigen Substanzen waren als Ausdruck einer intakten Nierenfunktion nicht erhöht. Die Serumamylasewerte persistieren seit 2 Jahren (Abb. 1). Die Patientin bot keine Oberbauchsymptomatik, die Parotis war nicht vergrößert. Ein Malabsorptionssyndrom konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. In der Oberbauchsonographie war das Pankreas nicht verändert. Diabetische Gefäßkomplikationen waren nicht nachweisbar.
Laborbefunde bei der Aufnahme: BSG, Blutbild, Serumelektrolyte, harnpflichtige Substanzen und Gerinnungsparameter im Normbereich. Gesamteiweiß 74 g/l bei normaler Serumelektrophorese. Blutzuckerwerte im Tagesprofil zwischen 43 und 293 mg/dl. Sonst unauffällige Enzymwerte (GOT/GPT, alkalische Phosphatase, Gamma-GT, GLDH, Cholinesterase und Lipase) außer stark erhöhten Amylaseaktivitäten im Serum. Direkter und indirekter Coombs-Test negativ. Normale Immunelektrophorese. Keine selektive Vermehrung einzelner Immunglobulin-Fraktionen in der quantitativen Bestimmung, Nachweise auf antinukleäre Faktoren, mitochondriale und mikrosomale Antikörper sowie zirkulierende Antikörper gegen Rinder- und Schweineinsulin fielen negativ aus.
Durch weitere chromatographische und immunologische Untersuchungen konnte die Diagnose "Makroamylasämie" gestellt werden und die Existenz von Amylase-Immunglobulinkomplexen im Serum der Patientin nachgewiesen werden. Das Immunglobulin erwies sich als IgA vom Kappa-Leichtkettentyp (5).

Abb. 1: Persistierende Hyperamylasämie bei der Patientin Lui. R. Amylase- und Lipaseaktivitäten im Serum und Urin. Verlaufsbeobachtung über 20 Monate.

- • Amylase im Serum
- ○ Amylase im Urin
- □ Lipase im Serum



Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Makroamylase mit chromatographischen, elektrophoretischen und enzymkinetischen Methoden zu untersuchen und mit den Eigenschaften menschlicher Pankreas- und Speichelamylase und Amylase tierischer Herkunft zu vergleichen. Besonderes Interesse galt dabei den Möglichkeiten der Differenzierung von Makroamylase und Amylase und der Klärung ätiologischer Fragen.

In der Ausschlußchromatographie sollten Makroamylase und Amylase getrennt und ihr Elutionsprofil verglichen werden. Makroamylase sollte durch Säuredissoziation in seine beiden Komponenten Immunglobulin A und Amylase gespalten werden. Dabei sollte ihr Dissoziationsverhalten in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht werden. Es sollte geprüft werden, ob es dem Dissoziationsverhalten normaler Antigen-Antikörperkomplexe entspricht.
Mit einer für Amylaseisoenzymbestimmungen optimierten Elektrophorese sollten Makroamylase und Amylase differenziert werden.
Um Hinweise auf die Isoenzymkomponente des Amylase-Immunglobulinkomplexes zu erhalten, versuchten wir diese Enzymkomponente elektrophoretisch darzustellen.
In kinetischen Untersuchungen (Michaelis-Menten-Kinetik) sollten Makroamylase und ihre vom Immunglobulin freigesetzte Amylasekomponente mit Pankreas- und Speichelamylase verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Untersuchungsgut

- Serum der Patientin Lui. mit Makroamylasämie
- Urin und Speichel der Patientin Lui.
  Urin und Speichel wurden filtriert, zentrifugiert, verdünnt und mit Rinderalbumin versetzt (20 g/l), (Dupont Enzyme Diluent®).

- Serum eines Patienten mit Parotitis epidemica
- Serum eines Patienten mit akuter Pankreatitis
- Duodenalsaft: wurde unter endoskopischer Sicht von der Papille entnommen. Der Duodenalsaft wurde filtriert, zentrifugiert, verdünnt und mit Rinderalbumin versetzt (20 g/l).
- Schweineamylase: Pankreon® (Kali-Chemie Pharma Hannover) wurde in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und mit Rinderalbumin versetzt (20 g/l).

Alle Proben wurden gesplittet und bei -20° C aufbewahrt.

2.1.2. Chemikalien

- Tris HCl-Puffer

50 mmol/l	Tris	(Merck No. 8387)
20 mmol/l	NaCl	(Merck No. 6404)
20 mmol/l	$CaCl_2$	(Merck No. 2083)
200 mg/l	Natriumazid	(Merck No. 8688)

Der Puffer wurde mit 25 %iger HCl auf pH 7,2 eingestellt. (Merck No. 312)

- Glycin-Puffer:

50 mmol/l Glycin
20 mmol/l CaCl/l
200 mg/l Natriumazid
Der Puffer wurde mit 10 %iger NaOH auf pH 3,5 eingestellt.

- Elektrophorese-Puffer: (nach KÖMPF et al. 1979)

82,3 mmol/l Tris
76,2 mmol/l Histidin HCl
6,4 mmol/l Ca-Lactat
auf pH 7,3 mit 25 %iger HCl eingestellt.

- Amyloselösung:

0,4 %ige Amyloselösung
15 mmol/l NaCl
20 mmol/l Phosphatpuffer pH 7,1
Die Reagentien wurden dem Merckotest Art. 3301 entnommen.

- Agarose L Lot Nr. 2004 C (Behring-Werke Marburg)

Sephadex G 100 (Pharmacia Uppsala)

2.1.3. Geräte

- Pumpe: LKB 2120 VARIOPEREX ^{R} II PUMP
- Säule: 15 x 0,9 cm
- Durchflußphotometer zur Bestimmung der UV-Absorption bei 254 nm (LKB Uvicord Type 470 1A)
- Schreiber (LKB 2210 1-Channel Recorder)
- Fraktionssammler (LKB 2112 REDI RAC FRACTION COLLECTOR) siehe Abb. 2.

- Elektrophorese (LKB Multiphor 2117)
  (LKB Power Supply 2103)
- Auftragsfolie (LKB Sample Application Foil 2117206)
- Eppendorf Photometer Typ M 1101 Wechselautomatik mit Schreiber
- Konzentrator Minicon B 15 (Amicon Witten)
- Elektrophoresepapier: Whatman elektrode wicks (No. 2117-403 (LKB Bromma, Sweden))

2.1.4. Bestimmung der Amylaseaktivität

2.1.4.1. Kinetische UV-Methode zur alpha-Amylase-Bestimmung (Ultra Zyme Plus ^{R} alpha-Amylase Harleco 64982 AHS München)

Das Testprinzip beruht auf folgendem Reaktionsablauf:

Oligosaccharide (4-10 Glucosemoleküle) $\xrightarrow{\text{alpha-Amylase}}$ Maltose

Maltose $\xrightarrow{\text{alpha-Glucosidase}}$ 2 Glucose

Glucose + ATP $\xrightarrow{\text{Hexokinase}}$ Glucose-6-Phosphat + ADP

Glucose-6-Phosphat + NaD^+ + H_2O $\xrightarrow{\text{Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase}}$

6-Phosphogluconat + NAD^+ + H^+

Die Messung erfolgt im optischen Test bei 334 nm.

Im Gegensatz zum Originalansatz wurde die Reaktions-Temperatur von 25° C auf 37° C erhöht, das Probevolumen von 10 auf 50 Mikroliter erhöht, das Substratvolumen von 1000 Mikroliter auf 600 reduziert.

Durch diese Modifizierung ließen sich Präzision und Sensitivität der Methode soweit steigern, daß auch niedrige Amylase-Aktivitäten in verdünnten Lösungen (Chromatographie-Eluate) zuverlässig bestimmt werden konnten.

Der Umrechnungsfaktor ergab sich unter Einbeziehung der veränderten Volumenverhältnisse aus der Beziehung:

$$\text{Amylaseaktivität (U/l, } 37^{\circ}\text{ C)} = \text{E/min} \times 8171 \frac{650}{1010} \times \frac{10}{50}$$

$$= \text{E/min} \times 1052$$

= Umrechungsfaktor des Originalansatzes

2.1.4.2. Amyloklastische Methode (Merck Art. Nr. 3301)

Testprinzip: Alpha-Amylase baut Stärke zu reduzierenden Dextrinen und kleinen Zuckereinheiten ab. Nach einer definierten Reaktionszeit wird Jodlösung zugesetzt und die bei der Jodstärkereaktion entstandene Blaufärbung gegen den Blindwert gemessen. Die Extinktionsabnahme ist der abgebauten Substratmenge und damit der Amylaseaktivität proportional.

$$\text{Amylaseaktivität} = \frac{E_B - E_A}{E_B} \times 610$$

E_B: Extinktion des Blindwertes

E_A: Extinktion des Analysenwertes

Die Extinktionsmessung wird bei 620 nm durchgeführt.

Reaktionslösungen:

Puffer-Substrat: Originalansatz
0,2 g/l Amylose,
20 mmol/l Phosphatpuffer pH 7,1,
15 mmol/l NaCl
Farbreagenz: 0,008 N Jodlösung und HCl

2.2. Methoden

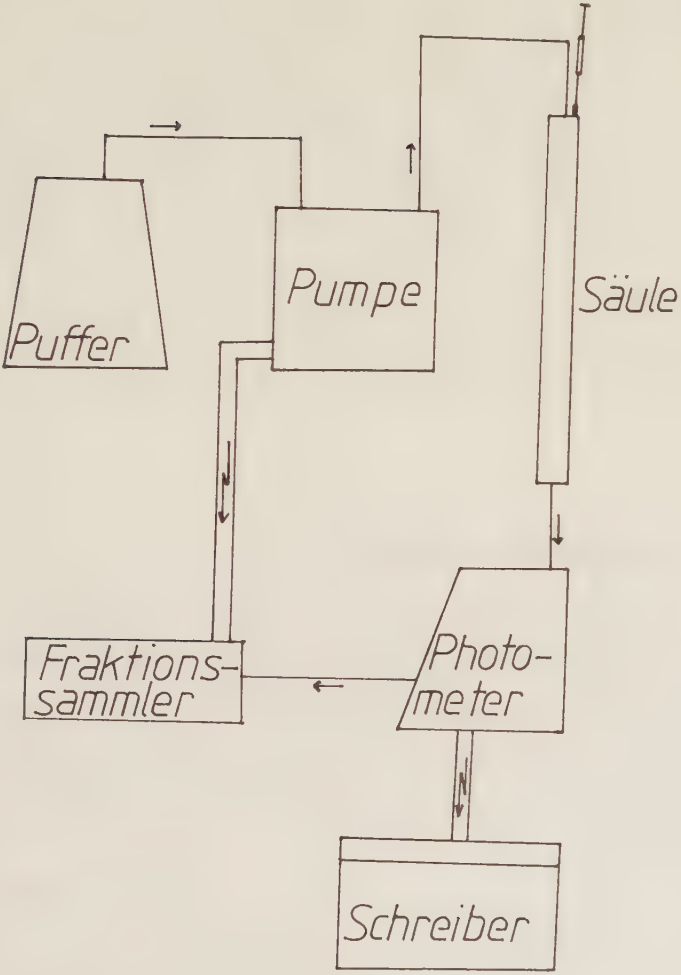
2.2.1. Ausschlußchromatographie zur Differenzierung von Amylase und Makroamylase

In der Ausschlußchromatographie werden Substanzen nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Große Moleküle werden dabei früher eluiert als kleine.
Zur ausschlußchromatographischen Differenzierung von Amylase und Makroamylase verwendeten wir eine Säule mit einem Bett von 15 x 0,9 cm. Als Trägermaterial diente Sephadex G 100. An die Säule war ein UV-Durchflußphotometer mit Schreiber zur kontinuierlichen Registrierung der Absorption des Eluates bei 254 nm geschaltet. Die Absorption bei 254 nm entspricht der Proteinkonzentration des Eluates. Mit Hilfe einer Präzisionsspritze (Hamilton) wurden die Proben auf die Säule aufgetragen. Zur Elution verwendeten wir Tris-HCl-Puffer (pH 7,2). Die einzelnen Eluatportionen von 0,4 ml wurden im Fraktionssammler gesammelt. Eine Pumpe sorgte für konstante Durchflußraten und dadurch für gut reproduzierbare Chromatogramme. Abbildung 2 zeigt den Versuchsaufbau. Die Amylaseaktivität der einzelnen Fraktionen wurden mit der modifizierten Harleco Methode Ultrazym (2.1.4.) gemessen.

Abb. 2: Schematischer Versuchsaufbau zur Ausschlußchromatographie

→ Fließrichtung des Puffers

↝ Elektrische Schaltung



2.2.2. Dissoziation von Makroamylase in Abhängigkeit vom pH-Wert

Makroamylase wurde im pH-Bereich von 3 bis 11 auf ihr Dissoziationsverhalten geprüft. Der gewünschte pH-Wert wurde durch Zugabe von 20 %iger Salzsäure bzw. 10 %iger Natronlauge eingestellt. Salzsäure bzw. Natronlauge setzten wir mit einer Mikroliterspritze unter gleichzeitigem Umrühren zu. Zur Einstellung eines Dissoziationsgleichgewichtes zwischen freier und gebundener Amylase wurde die Probe 120 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Säule jeweils mit 200 Mikrolitern beschickt. Im pH-Bereich von 3-6 eluierten wir mit Glyzin-Puffer, im Bereich von 6 bis 11 mit Tris-Puffer. Der pH-Wert des Puffers wurde dem jeweiligen Wert des Serums angeglichen.
Die Amylaseaktivitäten der einzelnen Fraktionen wurden bestimmt und anhand des Elutionsprofils entweder der Makroamylase oder der Amylase zugeordnet. Danach wurde der Quotient aus Makroamylaseaktivität und Gesamtaktivität gebildet.

2.2.3. Agarosegel-Elektrophorese

In der Agarosegelelektrophorese wird die Mobilität der Makroamylase dargestellt und mit den elektrophoretischen Eigenschaften normaler Pankreas- und Speichelamylase verglichen. Besonderes Interesse gilt auch der Identifizierung der Amylasekomponente unseres Amylase-Immunglobulin-Komplexes. Wir verwendeten ausschließlich den von KÖMPF (1979) für die Differenzierung der Isoamylasen empfohlenen Tris-Histidin-Puffer (siehe 2.1.2.).

a) Vorbereitung der Proben

Die am Komplex gebundene Amylase wurde durch Säuredissoziation bei pH 3,5 vom Immunglobulin gelöst. Durch Ausschlußchromatographie mit der in 2.2.1. beschriebenen Anordnung wurde die Amylase gewonnen. Die Eluatportionen (0,4 ml) wurden mit 0,1 ml Tris-Puffer (pH 9,5) neutralisiert, um eine Zerstörung der Amylase zu verhindern. Die Eluate wurden konzentriert (Minicon Konzentration B 15), um für die Elektrophorese ausreichende Enzymaktivitäten zu erzielen. Dabei erwies sich eine Amylaseaktivität der Probe von 400-800 U/l als sinnvoll (Kinetische UV-Methode, 2.1.4.1.).
Als Referenzen dienten Seren von Patienten mit akuter Pankratitis und Parotitis, die ebenfalls auf eine Aktivität von 800 U/l eingestellt wurden. Speichel wurde filtriert, verdünnt und auf eine Aktivität von ca. 800 U/l eingestellt. Urin der Patientin Lui. R. wurde zentrifugiert, filtriert und aufgrund seiner geringen Aktivität auf das ca. 100-fache konzentriert. Speichel und Urin wurde in jedem Fall Rinderalbumin zugesetzt (20 g/l).

b) Herstellung des Trägermediums

Es wurden 9,4 x 8,3 x 0,3 cm große Glasplatten benutzt. Agarose L wurde in einer Konzentration von 8 g/l mit einer 1 : 1 verdünnten Tris-His-Pufferlösung angesetzt, bis zum Klarwerden im Rücklaufkühler aufgekocht und mit einer Temperatur von ca. 60° C auf die Glasplatten gegossen. Der Ansatz wurde so berechnet, daß eine Agaroseschichtdicke von ca. 2 mm entstand. Agarose L zeichnet sich durch besonders geringe Elektroendosmose aus.

c) Auftragtechnik

Amylasehaltige Proben wurden mit einer Präzisionsspritze (Hamilton, 10 µl) aufgetragen. Die Agarosegelschicht wurde kurz mit Elektrophoresepapier bedeckt, um die obere Schicht abzutrocknen. Nach Entfernung des Papiers legten wir

eine Auftragschablone auf, in die schmale Schlitze zum Auftragen gestanzt sind. Ein definierter Teil der Probe wurde in die Agarose eingesogen. Wir ließen die Probe 5 Minuten einwirken und entfernten die Schablone.
Wie sich im Verlauf dieser Untersuchung zeigte, sollte generell Mundschutz getragen werden, da bereits geringe Verunreinigungen durch Speichelamylase (Sprechen, Husten) erhebliche Artefakte erzeugen.

d) Durchführung der Isoamylasen-Elektrophorese

Bei einer Spannung von 8 Volt/cm war die elektrophoretische Auftrennung der Isoamylasen in unserem wassergekühlten Elektrophoresesystem nach ca. 5 Stunden abgeschlossen. Der Strom wurde dabei auf 150 mA limitiert.

e) Darstellung der Isoamylasemuster

Die Agaroseplatten wurden mit einer 0,4 %igen Amyloselösung überschichtet und 30 Minuten bei 37° C und nach Abgießen der Amyloselösung nochmals 20 Minuten bei derselben Temperatur inkubiert. Anschließend wurden die Agaroseplatten mit Jod-Salzsäurelösung überschichtet. Aufgrund des eingesogenen Substrates färbten sich die Agaroseplatten blau, die Amylasebanden dagegen blieben weiß. Durch die 1n HCl-Lösung wurde die Amylasereaktion abgebrochen und die Agaroseplatten mehrere Wochen konserviert. Die typischen Befunde wurden im Durchlicht photographiert.

2.2.4. Michaelis-Konstanten (Km-Werte)

Von folgenden Amylasen wurden die Michaelis-Konstanten bestimmt:

1) Makroamylase aus Serum Lui. R.
2) Vom Komplex bei pH 3,5 freigesetzte Amylase, wie in 2.2.2. beschrieben
3) Amylase aus Duodenalsaft (Pankreas-Typ)
4) Menschliche Speichelamylase (Präparation 2.1.1.)
5) Pankreasamylase vom Schwein (Präparation 2.1.1.)

Die Amylase-Aktivitäten lagen zwischen 450 und 600 U/l.

Für ein Michaelis-Menten-Diagramm werden die Substratumsatzgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Als Substrat wurden jeweils 20 ml Amyloselösung verschiedener Konzentrationen in einen Meßkolben gegeben und in einem Wasserbad auf 37° C erwärmt. Zu diesen Ansätzen wurden 0,2 ml der amylasehaltigen Proben pipettiert. Unmittelbar danach wurde 1 ml-Aliquot dieses Ansatzes in ein Reagenzglas mit 10 ml Jod-Salzsäurelösung überführt und damit die Enzymreaktion gestoppt. Nach 10 Minuten konnte der gebildete, blaue Farbstoff gemessen werden. Seine Extinktion entsprach der Substratkonzentration zur Zeit Null. Nach Ablauf jeder weiteren Minute wurde ein Aliquot von 1 ml entnommen und analog behandelt.

Für jede Substratkonzentration ergibt sich ein Extinktions-Zeit-Diagramm. Aus dem linearen Anfangsteil der Kurve wird die Steigung bestimmt. Diese Steigung ist proportional zur Umsatzgeschwindigkeit bei der verwendeten Substratkonzentration. Der erhaltene Wert ergibt einen Punkt auf dem Umsatzgeschwindigkeits-Substratkonzentrationsdiagramm nach Michaelis und Menten (Abb. 10 (6)).

Bei der Darstellung nach Michaelis und Menten erhält man eine Sättigungskurve. Die maximale Substratumsatzgeschwindigkeit (Vmax) ergibt sich aus der Höhe des Plateaus. Der Km-Wert stellt die Substratkonzentration bei halbmaximaler Substratumsatzgeschwindigkeit (Vmax/2) dar. Der Km-Wert wird graphisch ermittelt.

Eine weitere Darstellung dieser Beziehung kann nach Lineweaver-Burk durchgeführt werden (Abb. 11).
Im Lineweaver-Burk-Diagramm erhält man eine Gerade, die Abszisse und Ordinate schneidet. Aus dem Schnittpunkt mit der Ordinate erhält man Vmax. Der Schnittpunkt mit der Abszisse ergibt den negativen Kehrwert des Km-Wertes (-1/Km). Die graphische Bestimmung des Km-Wertes aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm ist exakter. Falls eine Hemmung der Enzymreaktion durch Substrathemmung auftritt, bevor das Plateau im Michaelis-Menten-Diagramm-erreicht ist, kann der Km-Wert nur nach Lineweaver-Burk bestimmt werden.
Die Paramter der Ausgleichsgerade im Lineweaver-Burk-Diagramm wurden über eine lineare Regression ermittelt. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ergibt den negativen Kehrwert des Km-Wertes (-1/Km). Durch Kehrwertbildung und Änderung des Vorzeichens erhält man den Km-Wert.

3. Ergebnisse

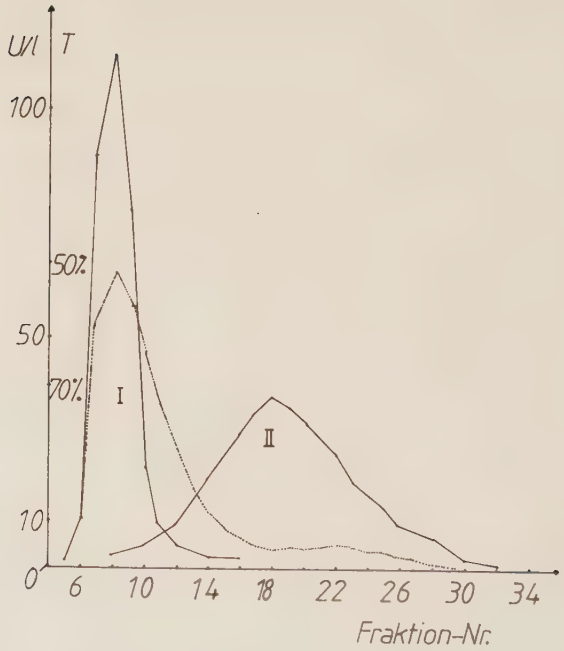
3.1. Ausschlußchromatographie zur Differenzierung von Makroamylase und Amylase

In der Ausschlußchromatographie auf Sephadex G 100 ließen sich Amylase und Makroamylase trotz einer geringen Säulenlänge gut differenzieren. Dazu mußten Volumen und Aktivitäten der Amylaseproben so gewählt werden, daß eine nur geringe Überlappung des Makroamylase- und des Amylaseprofils resultierte und andererseits die Aktivitäten im Eluat für eine zuverlässige Bestimmung ausreichend hoch waren. Ein Auftragvolumen von 200 Mikroliter Serum bei einer Amylaseaktivität von 1000-1500 U/l war für die chromatographische Differenzierung von Amylase und Makroamylase geeignet. Hiermit konnte die Überlappung beider Profile auf ein Minimum reduziert und dennoch ausreichend hohe Amylaseaktivitäten im Eluat erzielt werden.
Die Makroamylase erschien im Totvolumen der Säule in den Fraktionen 5-14 als schmale, steil ansteigende Kurve (Abb. 3). Normale Amylase dagegen befand sich in den Fraktionen 12 - 32 mit Maximum in Fraktion 18. Da die beiden Kurven sich etwas überlappten, mußte eine Grenze zwischen Amylase und Makroamylase gezogen werden. Die Fraktionen 5 bis einschließlich 12 wurden der Makroamylase zugeordnet, die Fraktionen 13-30 der normalen Amylase.
Die Proteinkurve besitzt einen steil ansteigenden, hohen Peak, der in eine flach auslaufende Kurve übergeht. Dieser flach auslaufende Teil zeigt zwischen Fraktion 22 und 25 einen diskreten Hochpunkt. Der hohe Peak steigt zusammen mit dem Makroamylasepeak an, ist jedoch nach rechts breiter. Er entspricht den Gamma-Globulinen. Die Amylase wurde mit den kleineren Proteinmolekülen eluiert. Der Amylasepeak fiel weitgehend mit dem flachen, auslaufenden Teil der Proteinkurve zusammen. In dem flachen, auslaufenden Anteil der Proteinkurve erscheinen die kleineren Proteinmoleküle wie Präalbumin, Albumin und alpha-1-Globuline. Eine exakte Molekulargewichtsbestimmung und damit eine genaue

Zuordnung der Amylase zu den Proteinen war aufgrund der geringen Säulenbettlänge nicht möglich.

Abb. 3: Darstellung von Makroamylase (I) und normaler Amylase (II) in der Ausschlußchromatographie auf Sephadex G 100, Säulenbett 15 x 0,9 cm, Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer, pH 7,2; Fraktionsgröße 0,4 ml; Proteinkurve (gestrichelt) Transmission bei 254 nm.

Ordinate: Amylaseaktivität in U/l und Transmission bei 254 nm in Prozent.



3.2. Dissoziationsverhalten der Makroamylase in Abhängigkeit vom pH-Milieu

Makroamylase disssoziierte sowohl im sauren als auch alkalischen Milieu. Bei pH 3,5 waren die Amylase-Immunglobulin-Komplexe nahezu vollständig dissoziiert.
Zur Aufstellung unserer Dissoziationskurve gingen wir folgendermaßen vor: Die Amylaseaktivitäten der einzelnen Fraktionen wurden bestimmt und aufgrund des Elutionsprofils als Makroamylase oder normale Amylase klassifiziert.
Durch Addition der Aktivitäten der Fraktionen 5 - 12 erhielten wir die Aktivität der Makroamylase. Die Addition der Aktivitäten der Fraktionen 13 - 30 ergab die Aktivität der normal großen Amylase. Die Summe beider Werte stellte die Gesamtaktivität dar. Es wurde der Quotient aus Makroamylaseaktivität und Gesamtaktivität für den jeweiligen pH-Wert gebildet.
Bei pH 3,5 waren die Amylase-Immunglobulinkomplexe nahezu vollständig dissoziiert. Es ergab sich das typische Amylaseprofil. Mit steigendem pH-Wert nahm die Dissoziation rasch ab (Abbildung 4 zeigt die Situation bei pH 4). Hier lag bereits 40 % der Gesamtaktivität als Makroamylase vor. In Abbildung 5 sind die Verhältnisse bei pH 9,1 dargestellt. In Abbildung 6 ist der Anteil der Makroamylase an der Gesamtaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgetragen. Die Dissoziation fand vor allem zwischen pH 3,5 und pH 4,0 statt. Im pH-Bereich von 4 bis 7 und 7 bis 11 war die Dissoziation wesentlich geringer.
Bei pH 7,3 lag nicht nur, wie in 3.1. gezeigt, ausschließlich Makroamylase vor, sondern es fanden sich auch ca. 7 % normale Amylase. Diese Verschiebung resultierte daher, daß die Grenze zwischen Makroamylase und Amylase wegen der geringen Überlappung beider Kurven zwischen Fraktion 12 und 13 gezogen werden mußte; die Makroamylase befand sich jedoch in den Fraktionen 5 - 14. Konsequenterweise mußte die Amylaseaktivität in Fraktion 13 und 14 bei allen pH-Werten der normalen Amylase zugerechnet werden. Analoges galt für die Situation bei pH 3,5.

Abb. 4: Ausschlußchromatogramm von Makroamylaseserum bei pH 4 auf Sephadex G 100; Säulenbett 15 x 0,9 cm; Elutionspuffer: Glyzin-Puffer pH 4; Fraktionsvolumen 0,4 ml.
Makroamylase (I), normale Amylase (II),
Proteinkurve (gestrichelt) ≙ Transmission bei 254 nm.
Ordinate: Amylasekativität in U/l und Transmission bei 254 nm in Prozent.

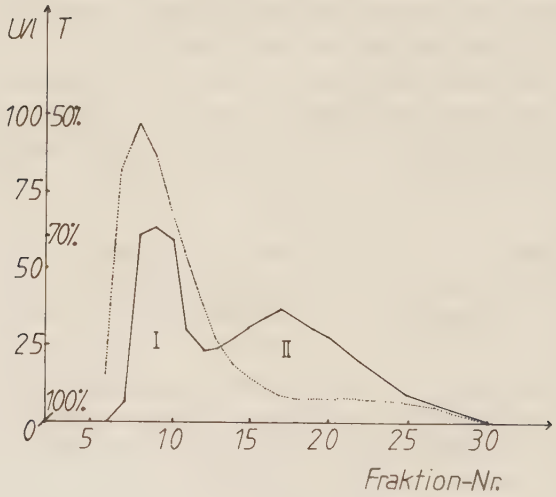


Abb. 5: Ausschlußchromatogramm von Makroamylaseserum bei pH 9,1 auf Sephadex G 100; Säulenbett 15 x 0,9 cm; Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer pH 9,1; Fraktionsvolumen 0,4 ml.
Makroamylase (I), normale Amylase (II)
Proteinkurve (gestrichelt) ≙ Transmission bei 254 nm.
Ordinate: Amylaseaktivität in U/l und Transmission bei 254 nm in Prozent.

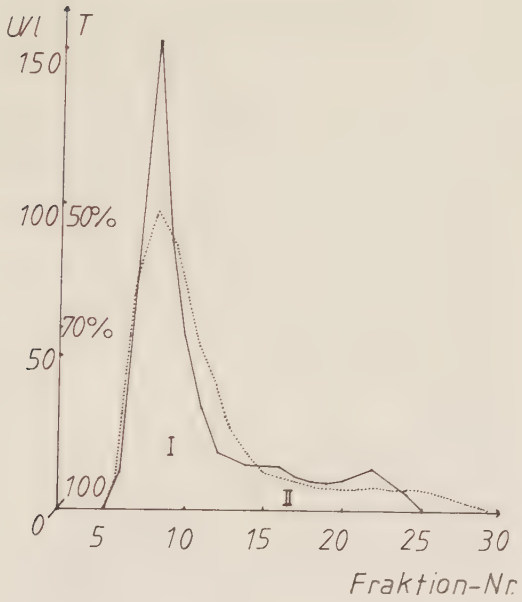
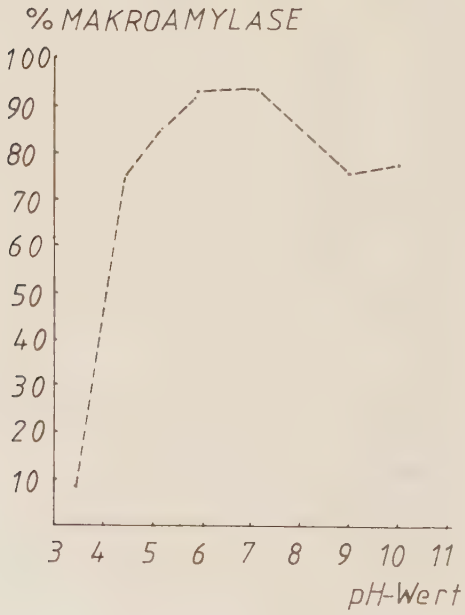


Abb. 6: Dissoziation von Makroamylase in Abhängigkeit vom pH-Wert (Abszisse). Auf der Ordinate ist das Verhältnis Makroamylase zu freier Amylase aufgetragen. Im pH-Bereich von 3,4 bis 5,5 wurde Glyzin-Puffer (siehe 2.1.2.), von pH 5,5 bis 10 Tris-HCl-Puffer (siehe 2.1.2.) zur Elution verwendet.



3.3. Agarosegelelektrophorese

Unsere spezielle Elektrophorese (Agarose, Tris-Histidin-Puffer; pH 7,3) ermöglichte es, Makroamylase eindeutig von Pankreas- oder Speichelamylase zu trennen. Dabei waren auch diese beiden Isoenzyme gut zu differenzieren.
Das elektrophoretische Verhalten der Makroamylase unterschied sich grundsätzlich von dem der anderen untersuchten Amylasen. Makroamylase wanderte unter den gewählten Versuchsbedingungen zur Anode, während Pankreas- und Speichelamylase zur Kathode wanderten. Die Mobilität der Amylase vom Pankreastyp war dabei größer als die der Speichelamylase. Neben einer breiten Pankreasamylasebande zeigte sich häufig eine zweite, schmale Pankreasamylasefraktion, die zwischen breiter Pankreasamylasebande und Speichelamylasebande lag. Die Speichelamylasefraktion lag zwischen Auftragstelle und der breiten Pankreasamylasebande.
Im Serum von Pankreatitiskranken befand sich überwiegend Pankreasamylase, jedoch auch eine geringe Menge Speichelamylase. Im Serum von Patienten mit Parotitis fanden wir neben Speichelamylase auch eine deutliche Pankreasamylasefraktion.
Um über die Isoamylase, die an der Komplexbildung beteiligt ist, Aufschluß zu erhalten, analysierten wir Eluate der Ausschlußchromatographie nach Ansäuerung auf pH 3,5. Das Ergebnis zeigen die Abbildungen 7, 8 und 9. Wir erhielten neben einer deutlichen Pankreasamylasebande und einer zweiten, schwachen Pankreasamylasefraktion eine nur angedeutete Speichelamylasebande. Auch im Urin der Patientin Lui. R. fand sich überwiegend Pankreasamylase und eine kaum erkennbare Speichelamylasebande. Selbst nach 100facher Konzentrierung des Urins erhielten wir nur geringe Aktivitäten.
Es handelte sich also bei der vom Komplex freigesetzten Amylase überwiegend um Amylase vom Pankreastyp.
Eine Quantifizierung der Amylaseisoenzyme gelang uns nicht. Wir hielten deshalb die typischen Befunde photographisch fest. Nach Schätzung jedoch beträgt der Anteil der Pankreas-

amylase ungefähr 90 %. Auch der Urin unserer Patientin zeigte das entsprechende Bild.

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen Photographien einiger Elektrophoreseläufe. Abbildung 9 gibt eine schematische Zusammenstellung der wichtigsten elektrophoretischen Befunde wieder.

Abb. 7: Eletrophoretische Trennung von Amylasen in Agarosegel (Tris-Histidin-Puffer, pH 7,3)
Originalphotographie
Anode (+), Kathode (-), Auftragsstelle A
1 und 5: Pankreasamylase aus Duodenalsaft
2 und 4: vom Komplex freigesetzte Amylase
3: Speichelamylase von Lui. R.
6: Serumamylase eines Pankreatitiskranken

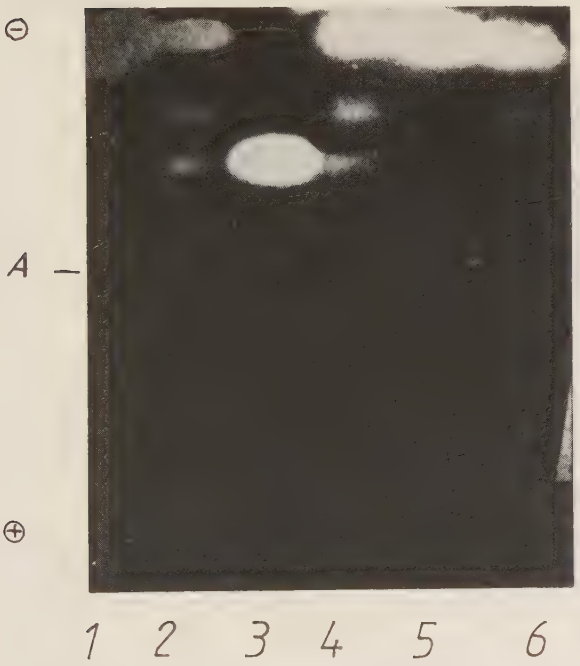


Abb. 8: Elektrophoretische Trennung von Amylasen in Agarosegel (Tris-Histidin-Puffer, pH 7,3)
Anode (+), Kathode (-), Auftragsstelle A
1: Speichelamylase
2: vom Komplex freigesetzte Amylase (hohe Aktivität)
3: Serum eines Pankreatitiskranken
4: vom Komplex freigesetzte Amylase (geringe Aktivität)
5: Makroamylase

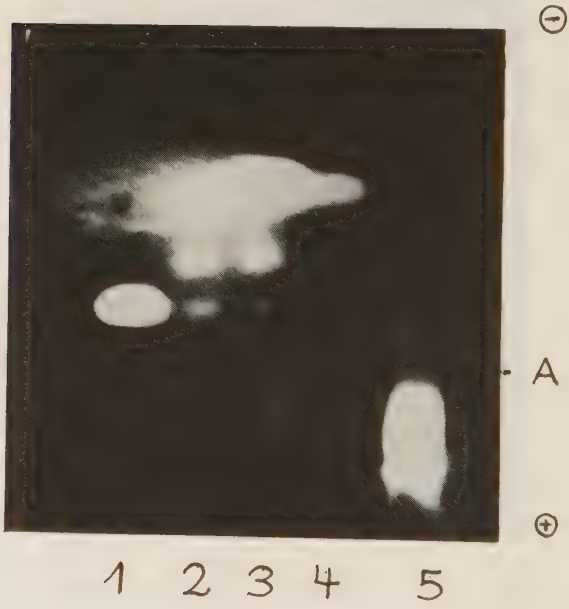
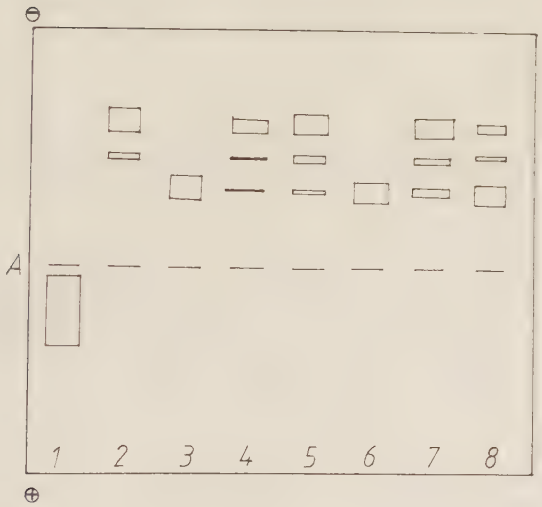


Abb. 9: Schematische Zusammenstellung von Isoamylasemustern in der Agarosegelektrophorese
Anode (+), Kathode (-), Auftragstelle (A)
1: Makroamylase der Patientin Lui. R.
2: Pankreasamylase
3: Speichelamylase
4: Amylase im Urin der Patientin Lui. R.
5: Vom Komplex freigesetzte Amylase von Lui. R.
6: Speichelamylase von Lui. R.
7: Serumamylase eines Pankreatitiskranken
8: Serumamylase eines Parotitiskranken



3.4. Michaelis-Konstanten (Km-Werte)

Die Km-Werte der verschiedenen Amylasen ließen sich in mehrere Gruppen einteilen.
Die Pankreasamylase, die vom Komplex freigesetzte Amylasekomponente unserer Patientin und die Schweineamylase besaßen Km-Werte, die sehr nahe beieinander lagen. Der Km-Wert der Makroamylase war etwas höher. Der Km-Wert der Speichelamylase lag bedeutend höher.

Abbildung 10 zeigt das Michaelis-Menten-Diagramm, Abbildung 11 die Darstellung nach Lineweaver-Burk. Im Michaelis-Menten-Diagramm ist kein Plateau zu erkennen. Bei höheren Substratkonzentrationen als 0,2 g/l trat Substrathemmung auf. In Tabelle 1 sind die Michaelis-Menten-Konstanten der verschiedenen Amylasen zusammengestellt.

Tab. 1: Zusammenstellung der Michaelis-Menten-Konstanten der verschiedenen Amylaseenzyme für Amylose als Substrat

	Km g/l
Pankreasamylase	0,203
freigesetze Amylasekomponente der Makroamylase	0,230
Makroamylase	0,336
Schweineamylase	0,245
Speichelamylase	11,079

Abb. 10: Michaelis-Menten-Diagramm für Amylose als Substrat

• Pankreasamylase; ▼ Speichelamylase;

◇ vom Komplex freigesetzte Amylase der Patientin Lui. R.;

• Makroamylase; + Schweineamylase

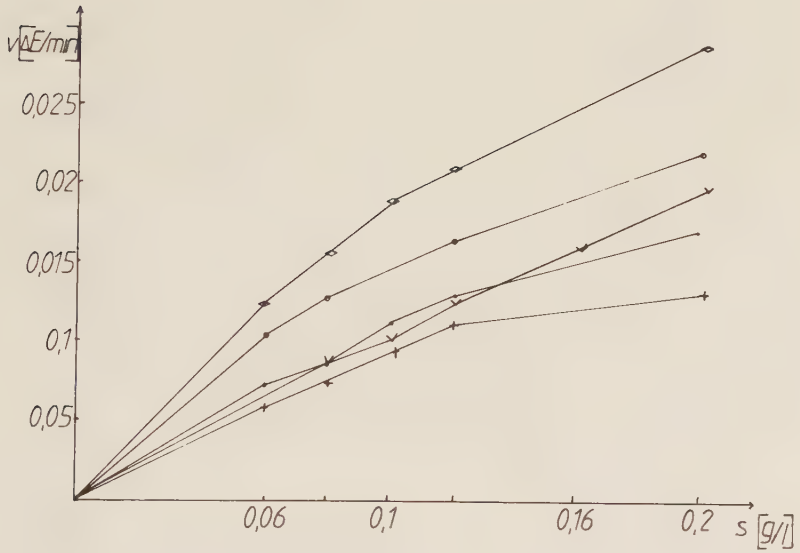
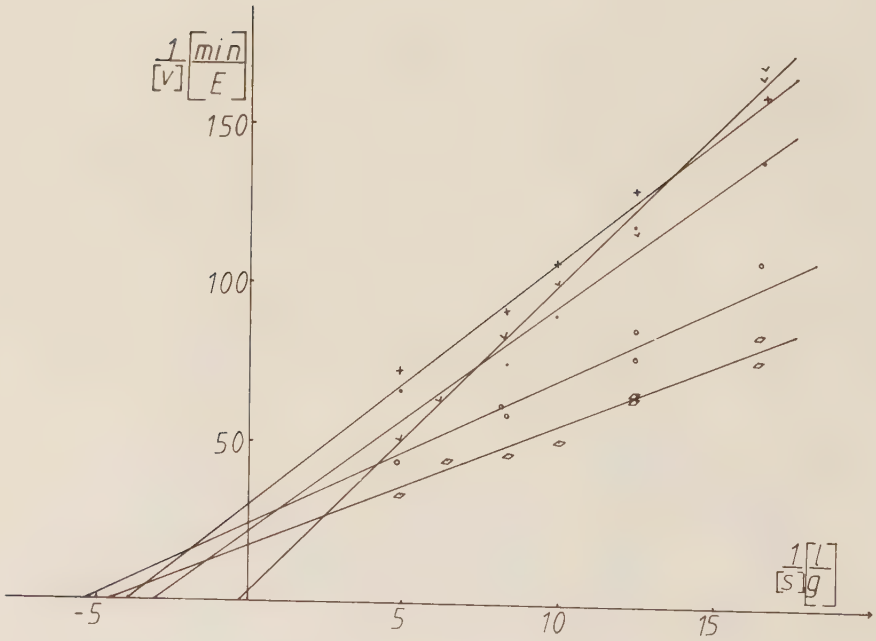


Abb. 11: Lineweaver-Burk-Diagramm für Amylose als Substrat

o Pankreasamylase; v Speichelamylase;

◇ vom Komplex freigesetzte Amylase der Patientin Lui. R.;

• Makroamylase; + Schweineamylase



4. Diskussion

4.1. Ausschlußchromatographie

In der Ausschlußchromatographie auf Sephadex G 100 ließen sich Makroamylase und Amylase gut trennen: Die Makroamylase erschien in den frühen Fraktionen zusammen mit den großmulekularen Proteinen; dagegen wurde normale Amylase, ob Parotis- oder Pankreasamylase später eluiert zusammen mit den Proteinen von einem Molekulargewicht von ca. 20 000. Da aber Amylase ein Molekulargewicht von ca. 45 000 besitzt, mußte angenommen werden, daß eine Interaktion zwischen Sephadex und Amylase bestand, die die Elution verzögerte (22). Dieser Interaktion könnte eine kurzfristige Enzym-Substrat-Bindung zugrunde liegen: Sephadex, ein Dextran, wird von Amylase als Substrat betrachtet. Jedoch kommt es nicht zur Spaltung des Moleküls, da menschliche Amylase für α-glykosidische Bindungen spezifisch ist. Trotz einer geringen Säulenlänge und der Verwendung von Sephadex des Typs G 100 erhielten wir eine gute Auftrennung von Makroamylase und Amylase. Da auch der zeitliche und apparative Aufwand dieser Methode nicht zu groß ist, ist die Ausschlußchromatographie als Suchtest auf Makroamylase geeignet.

4.2. Dissoziationsverhalten und Natur der Makroamylase

Unsere Makroamylase dissoziierte sowohl im sauren als auch alkalischen Milieu. Im pH-Bereich von 4 bis 7 und 7 bis 11 war die Dissoziation nur schwach. Bevorzugt aber dissoziierte die Makroamylase zwischen pH 3 und pH 4. Bei pH 3,4 war die Makroamylase vollständig in Enzym und Antikörper gespalten. Dagegen fanden FRIDHANDLER et al. (1974) auch Makroamylasekomplexe, die überhaupt nicht oder nur teilweise dissoziierten. So erhielten sie in vier von 34 Fällen von Makroamylasämie absolut keine Dissoziation. Die übrigen Seren

dissoziierten teilweise oder wie in unserem Fall vollständig. KANNO et al. (1976) dagegen fanden eine totale Dissoziation in allen acht von ihnen untersuchten Makroamylasen. Typisch für einen Antigen-Antikörperkomplex ist die vollständige Dissoziation bei pH 3,4 (3). Aus dieser Tatsache kann abgeleitet werden, daß Makroamylasen, die nicht dissoziieren, keine Antigen-Antikörperkomplexe sind, sondern anderer Natur sein dürften, wie bereits in der Einleitung erwähnt. Der umgekehrte Schluß, daß alle Makroamylasen, die bei pH 3,4 vollständig dissoziiert sind, Antigen-Antikörperkomplexe sind, ist dagegen nicht zulässig. Insofern ist eine positive Identifizierung des Bindungspartners erforderlich.

Liegen Amylase-Immunglobulinkomplexe vor, ist zu vermuten, daß dieser Bindung eine spezifische Antigen-Antikörperreaktion zugrunde liegt: Antikörper bestehen aus einem Fc und zwei Fab-Fragmenten. Eine spezifische Bindung findet zwischen Fab-Fragmenten und Antigen statt. Mit Hilfe spezifischer Antiseren gegen die Fab- und Fc-Bruchstücke der Immunglobulin-Komponente genuiner Makroamylase wiesen KANNO et al. (1979) immunelektrophoretisch nach, daß Amylaseaktivität ausschließlich mit den Fab-Fragmenten assoziiert war. Dies spricht für eine spezifische Antigen-Antikörperbindung.

4.3. Agarosegelelektrophorese

Elektrophoretische Untersuchungen über Amylaseisoenzyme und Makroamylase wurden mit unterschiedlichen Trägermedien und Puffersystemen durchgeführt.
In unseren elektrophoretischen Untersuchungen (Agarose; Tris-Histiden-Puffer; pH 7,3) konnten wir eine gute Separierung der Makroamylase von den anderen Isoenzymen erzielen. Dabei ließen sich auch die beiden Isoenzyme Pankreas- und Speichelamylase vortrefflich differenzieren.

Auch in anderen Studien konnte eine gute Trennung von Makroamylasen und Amylaseisoenzymen erzielt werden: So verwendete SKUDE (1979) einen Barbitalpuffer (pH 8,8) und als Trägermaterial Agarose, die Polyacrylamid enthielt. OTSUKI et al. (1976) führten ihre Untersuchungen mit einem 0,19 molaren Tris-Puffer als Gelpuffer (pH 8,8) und einem 0,3 molaren Boratpuffer (pH 8,2) durch. Als Trägermaterial verwendeten sie Polyacrylamid. Im Gegensatz zu Agarose ist die Handhabung von Polyacrylamid schwierig und zeitraubend. Demgegenüber ist die von uns benützte Methode vergleichsweise einfach.

Die oben erwähnten Autoren fanden eine größere Mobilität der Speichelamylase gegenüber der Pankreasamylase. Auch wanderten alle Isoenzyme einschließlich der Makroamylase zur Anode. Dagegen wanderten in unseren Untersuchungen die Amylaseisoenzyme zur Kathode, wenn auch mit unterschiedlicher Mobilität. Unsere Makroamylase jedoch wanderte zur Anode. Amylase hat ihren isoelektrischen Punkt bei pH 5,3 (7). Daher wäre zu erwarten, daß Amylase bei dem von uns verwendeten pH-Wert von 7,3 zur Anode und nicht, wie in unserem Falle, zur Kathode wandert. Dieser bemerkenswerte Effekt könnte durch die Anwesenheit von Histidin bedingt sein. Immunglobulin A hat seinen isoelektrischen Punkt bei pH 6,4 (6) und besitzt bei pH 7,3 eine anodische Mobilität. Ebenso wie IgA selbst zeigten auch die Amylase-Immunglobulin-A-Komplexe (Makroamylase) eine anodische Mobilität. Offenbar bestimmte somit der Immunglobulinanteil des Komplexes die Wanderungsrichtung der Makroamylase.

Die Papierelektrophorese hat sich nicht bewährt: DAVIS et al. (1971) führten eine papierelektrophoretische Untersuchung mit Veronalpuffer bei pH 8,6 durch. Die Differenzierung von Makroamylase und Amylase gelang nicht. Es ergab sich nur eine Amylasebande. Die Vermutung lag nahe, daß unter den Bedingungen der Papierelektrophorese eine Dissoziation des Komplexes stattgefunden hatte. Die Autoren eluierten die Amylasebande des Papierstreifens und führten eine ausschlußchromatographische Untersuchung des Eluates durch. Sie

stellten dabei fest, daß der großmolekulare Anteil im Vergleich zum Serum abgenommen hat. Diese Beobachtung steht in Einklang mit unseren Untersuchungen. Dort war der Komplex bei pH 9,1 bereits teilweise dissoziiert. Unter den Bedingungen der Papierelektrophorese dürfte die Dissoziation von Amylase und Immunglobulin wegen der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität dieser beiden Komponenten zusätzlich verstärkt werden.

4.4. Kinetik

Wie unsere Ergebnisse zeigen, bestanden zwischen den Km-Werten der Pankreasamylase und der Enzymkomponente der Makroamylase nur geringe Unterschiede. Der Km-Wert der Makroamylase lag 40 % höher. Auffälig dagegen war die Höhe des Km-Wertes der Speichelamylase.
Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß die Amylasekomponente der Makroamylase hauptsächlich aus Pankreasamylase besteht. Wäre der Anteil der Speichelamylase am Komplex höher, wäre ein größerer Km-Wert zu erwarten. Unsere kinetischen Untersuchungen bestätigen damit das elektrophoretisch nachgewiesene Verhältnis von Speichel- und Pankreasamylase.

Während kinetischer Untersuchungen von in vitro hergestellter Makroamylase machte ILS (1982) eine überraschende Beobachtung. Er bestimmte die Aktivität einer Reihe von Proben, die Amylase enthielten (Speichel, Pankreas- und Schweineamylase). Nach Zusatz der durch Säuredissoziation gewonnenen spezifischen IgA-Antikörpern erhielt er einen Aktivitätsanstieg um ca. 20 %. Die Antikörper aktivierten offensichtlich die Amylasen.
Über die Kinetik von Makroamylasen liegen bisher kaum Ergebnisse vor: So fanden HOBART et al. (1970) "keine kinetischen Unterschiede" zwischen Amylase und Amylasekomponente der Makroamylase, HARADA et al. (1975) keine signifikanten Differenzen in der "Kinetik" zwischen Makroamylase und Amy-

lase. LEVITT et al. (1968) erhielten "keinen großen Unterschied" zwischen den Km-Werten der Makroamylase und ihrer Enzymkomponente. Allerdings war der Km-Wert der Makroamylase um 20 % höher. Entsprechend stellten BERK et al. (1969) in zwölf Fällen fest, daß die Km-Werte der Makroamylasen um 30 bis 90 % höher lagen als die "normaler Amylase". Allerdings war in diesen Fällen nicht bekannt, ob Amylase-Immunkomplexe vorlagen. Somit sind aufgrund dieser spärlichen Angaben und der Heterogenität der untersuchten Makroamylasen Vergleiche von kinetischen Parametern bisher nicht möglich.

4.5. Ätiologie der Makroamylasämie

In der Mehrzahl der Fälle von Makroamylasämie waren neben Makroamylase zusätzlich unterschiedliche Mengen normaler Amylase vorhanden (8,9). Vermutlich stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen freier Amylase und an Immunglobulinen gebundener Amylase ein: Freie Amylase wird renal eliminiert, neue strömt aus Pankreas und Speicheldrüsen nach. Die erhöhte Serumamylaseaktivität wäre somit Folge der Akkumulation von nicht-nierengängiger Makroamylase. In unserem Makroamylaseserum dagegen konnten wir weder chromatographisch noch elektrophoretisch erkennbare Mengen normaler Amylase nachweisen. Deshalb überrascht es nicht, daß auch die Amylaseaktivität im Urin nicht erhöht war. Das ausschließliche Vorkommen von Makroamylase läßt sich durch einen Antikörperüberschuß und eine hohe Bindungsaffinität der Amylase bindenden Immunglobuline erklären. Diese Amylase-Immunglobulin-Komplexe werden wahrscheinlich im RES abgebaut. Dies stellt den üblichen Weg der Eliminierung von Antigen-Antikörperkomplexen dar. Damit existiert ein zweiter Weg der Eliminierung von Amylaseaktivität, die sich dem Nachweis im Urin entzieht. Allerdings ist uns nicht bekannt, wieviel Amylaseaktivität im RES verschwindet. Die erhöhte Serumamylaseaktivität könnte somit auch durch eine erhöhte Sekretion von Amylase aus Pankreas oder Speicheldrüsen er-

klärt werden und nicht ausschließlich durch Akkumulation von nicht-nierengängiger Makroamylase. Damit wäre die Serumamylaseaktivität und Urinamylaseaktivität auch ohne Bindung der Amylase an Antikörper erhöht. Aufschluß über die absolute Höhe der Serumamylasewerte ohne Bindung an Antikörper könnte uns eine Immunsuppression geben, die zu einer starken Abnahme der Amylase bindenden Immunglobuline und damit zu einem unverfälschten Serumamylasespiegel führt.
Mit Hilfe unserer speziellen Elektrophorese wären wir dann in der Lage, das Isoenzymmuster der Amylasekomponenten der Makroamylase darzustellen. Bei Überwiegen eines Isoenzyms könnten wir wegen deren Organspezifität auf eine Störung im Pankreas oder Speicheldrüsen schließen. Beim Diabetes mellitus unserer Patienten verbietet sich eine Immunsuppression mit Glukokortikoiden oder anderen Immunsuppressiva aus medizinischen und ethischen Gründen. Deshalb waren wir darauf angewiesen, den Anteil von Pankreas und Speichelamylase an der Komplexbildung zu bestimmen. Beim Überwiegen eines Isoenzyms könnten wir wegen deren Organspezifität auf eine Störung in Pankreas oder Speicheldrüsen schließen. Unerläßlich für dieses Vorgehen ist jedoch die Kenntnis des Verhältnisses von Pankreas- und Speichelamylase bei Gesunden.
Das Verhältnis von Pankreas- zu Speichelamylase im Serum wird durch unterschiedliche Sekretion und Eliminierung bewirkt.
Beim Vorliegen von Antikörpern gegen Amylase jedoch kann eine unterschiedliche Affinität zu den beiden Isoenzymen das ursprüngliche Sekretionsverhältnis zugunsten eines Isoenzyms verändern. Um das Ausmaß dieser Veränderung zu erfassen, muß die Affinität der Antikörper zu beiden Isoenzymen bestimmt werden.
Völlig unabhängig vom Sekretionsverhältnis könnten wir uns bei Kenntnis eines Affinitätsunterschiedes eventuell Aufschlüsse über die Ätiologie der Makroamylasämie verschaffen.

Das normale Verhältnis von Pankreas- zu Speichelamylase bestimmten FRIDHANDLER et al. (1974) bei 27 Gesunden, nachdem sie beide Isoenzyme über einen Ionenaustauscher getrennt hatten: Sie fanden überwiegend Speichelamylase. Der Speichelamylaseanteil lag nie unter 44 %. Auch bei den meisten ihrer Makroamylasepatienten war vorwiegend Speichelamylase an der Komplexbildung beteiligt. Dabei war der Speichelamylaseanteil jedoch höher als bei Gesunden. FRIDHANDLER et al. untersuchten daraufhin die Affinität der Antikörper zu beiden Isoenzymen und fanden in den meisten Fällen eine höhere Affinität zur Speichelamylase. Sie erklärten damit das Überwiegen von Speichelamylase und verwiesen auf ein latentes pathologisches Geschehen in den Speicheldrüsen.
In unserem Falle jedoch überwog die Pankreasamylase eindeutig. Dabei war der Pankreasamylaseanteil höher als bei Gesunden. Hierfür bieten sich zwei Erklärungen an:

1. Die Sekretion aus dem Pankreas in den Kreislauf ist höher als die Sekretion aus den Speicheldrüsen.

2. Die Affinität der Antikörper zur Pankreasamylase ist höher.

ILS (1982) konnte zeigen, daß die zweite Annahme zutrifft: Die Affinität zur Pankreasamylase war beinahe doppelt so hoch wie die zur Speichelamylase. Dies deutet auf eine primäre Immunreaktion gegen Pankreasamylase hin. Die Reaktion der Antikörper mit anderen Isoenzymen wäre dann als Kreuzreaktion zu verstehen.
Die höhere Affinität der Antikörper zur Pankreasamylase verschiebt das ursprüngliche Sekretionsverhältnis durch bevorzugte Akkumulation von Pankreasamylase zugunsten eben dieser und verfälscht damit das ursprüngliche Sekretionsverhältnis der beiden Isoenzyme. Da die Affinität zur Speichelamylase niedriger ist, wird sie schwächer gebunden und müßte zwangsweise vermehrt im Urin ausgeschieden werden. Überraschenderweise jedoch fanden wir im Urin unserer Patientin nur Spuren von Speichelamylase und wesentlich mehr Pankreas-

amylase. Dies läßt den Schluß zu, daß auch die Sekretion von Pankreasamylase in die Blutbahn erheblich höher ist als die von Speichelamylase. Deshalb muß auch eine Störung des exokrinen Pankreas in Betracht gezogen werden. Zwar konnte eine Störung des exokrinen Pankreas mit den konventionellen diagnostischen Methoden (1.1.) nicht nachgewiesen werden; dennoch kann eine Minimalläsion, deren Feststellung sich diesen diagnostischen Methoden entzieht, nicht ausgeschlossen werden.

Zusammengefaßt stehen wir vor zwei Befunden, deren Koinzidenz mehr als zufällig erscheint: Wir finden eine höhere Sekretion von Pankreasamylase und gleichzeitig eine höhere Affinität der Antikörper zur Pankreasamylase. Beides spricht für eine primäre Immunreaktion gegen Pankreasamylase. Die Antikörperbildung gegen Pankreasamylase könnte durch eine chronisch erhöhte Sekretion von Pankreasamylase in den Kreislauf verursacht werden. Bei einer nicht-intrazellulären Substanz jedoch, wie es bei Amylase der Fall ist, wird ein solcher Autoimmunmechanismus bisher nur akzeptiert, wenn eine autologe Substanz eine Veränderung ihrer Molekularstruktur erfahren hat (4). Den Nachweis einer veränderten Pankreasamylase konnten wir nicht erbringen. Die beiden Enzymkomponenten unserer Makroamylase zeigten das identische elektrophoretische Verhalten wie entsprechende Amylasen anderer Herkunft. Pankreasamylase aus Duodenalsaft unserer Patientin stand uns allerdings nicht zur Verfügung. Jedoch zeigte die quantitativ größere Amylasekomponente der Makroamylase (Pankreasamylase!) das gleiche elektrophoretische Verhalten wie alle Pankreasamylasen anderer Herkunft. Somit konnten wir die Annahme einer Veränderung der Molekularstruktur der Pankreasamylase nicht beweisen. Allerdings muß eine geringfügige Strukturveränderung der Amylase, die immunologisch wirksam ist, nicht zwangsweise zu einem anderen elektrophoretischen Verhalten führen.

Auffällig war in unserem Falle die Koinzidenz zwischen insulinpflichtigem Diabetes mellitus und Makroamylasämie. Die Frage, ob hier ein kausaler Zusammenhang besteht, liegt daher nahe. Dies umso mehr, als der Diabetes mellitus auf der Basis einer Autoimmunreaktion gegen ß-Zellen entstehen kann. Neben der Makroamylasämie mit Bildung von IgA gegen Amylase könnte hier eine zweite abnorme Immunreaktion vorliegen. Dabei ist es möglich, daß auch das exokrine Pankreas in Mitleidenschaft gezogen wird. Der pathogenetische Mechanismus könnte eine primäre Störung des Immunsystems sein (primäre Immungenese). Falls unsere Vermutung einer Schädigung des exokrinen Pankreas zutrifft, so liegt neben dem Diabetes mellitus eine zweite Störung in einem Organverband vor. Ein gemeinsamer Pathomechanismus wäre denkbar (primäre Organgenese). Der Autoimmunmechanismus wäre dann als Reaktion auf ein primäres Organgeschehen zu verstehen. Ohne eine abnorme Disposition des Immunsystems wäre ein solcher Vorgang jedoch kaum vorstellbar, zumal wir keine abnormale Pankreasamylase finden konnten.

Denkbar wäre weiterhin, daß Insulinpräparate, die die Patientin jahrelang applizierte, noch heterologe Amylase in Spuren enthielten und eine Antikörperbildung provozierten. Die Antikörper würden dann im Sinne einer Kreuzreaktion auch mit den isologen Amylasen reagieren.
In der Literatur wurden mehrere Fälle von Makroamylasämie mit Diabetes mellitus geschildert. Jedoch konnten HELFAT et al. (1973) in ihrem Screening-Test bei Diabetikern keine erhöhte Inzidenz feststellen.

Über die Ätiologie der Makroamylasämie besteht somit keine endgültige Klarheit. Sie muß jedoch in die Differentialdiagnose der Hyperamylasämie einbezogen werden, da der Nachweis einer Makroamylasämie den Patienten vor unnötigen diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen bewahrt.

5. Zusammenfassung

Makroamylase wurde mit Hilfe chromatographischer, elektrophoretischer und enzymkinetischer Methoden untersucht und mit den Eigenschaften menschlicher Pankreas- und Speichelamylase und Amylase tierischer Herkunft verglichen.

1. Makroamylase ließ sich durch Ausschlußchromatographie auf Sephadex G 100 von der normalen Pankreas- und Speichelamylase differenzieren. Als großes Molekül wurde sie erheblich früher als normalgroße Amylase eluiert.

2. Bei der Säuredissoziation zeigte Makroamylase das typische Verhalten eines Antigen-Antikörperkomplexes. Sie war bei pH 3,4 vollständig dissoziiert. Auch im Alkalischen fand sich eine deutliche Dissoziation.

3. Eine spezielle Elektrophorese (Agarose; Tris-Histidin-Puffer; pH 7,3) ermöglichte es, Makroamylase eindeutig von Pankreas- und Speichelamylase zu trennen. Dabei liessen sich auch Pankreas- und Speichelamylase gut differenzieren. Dies erlaubte uns die Amylasekomponenten der Makroamylase zu identifizieren: Sowohl Pankreas- als auch Speichelamylase waren an der Komplexbildung beteiligt. Bei weiteren überwog jedoch Pankreasamylase. Desgleichen enthielt der Urin unserer Patientin neben Pankreasamylase nur Spuren von Speichelamylase.

4. Die weitgehende Identität von Pankreasamylase (Km = 0,203 g/l) und der Amylase des Makroamylasekomplexes (Km = 0,230 g/l) wurden durch unsere kinetischen Untersuchungen bestätigt. Ihre Michaelis-Konstanten waren nahezu identisch. Dagegen ergab sich für Makroamylase eine deutlich höhere Michaelis-Konstante (Km = 0,336 g/l).

6. Literaturverzeichnis

1. BERGGREN, T., M.D. LEVITT: An unusual form of macroamylasemia.
Gastroenterology 67, 149 - 154 (1974)

2. BERK, J. E., H. KIZU, P. WILDING and R. SEARCY: Macroamylasemia: A newly recognized cause for elevated serum amylase activity.
The New England Journal of Medicine 277, 941 - 946 (1967)

3. BERK, J. E., H. KIZU, S. TAKE and L. FRIDHANDLER: Macroamylasemia: Clinical and laboratory features.
Am. J. Gastroent. 53, 223 - 229 (1970)

4. BIER, GÖTZE, MOTAS DIAS DA SILVA: Experimentelle und klinische Immunologie.
Springer-Verlag, 249 - 276 (1979)

5. BOHNER, J., W. STEIN und J. DILGER: Immunglobulin A-Amylase-Komplexe als seltene Ursache einer Hyperamylasämie.
Klin. Wochenschr. 58, 403 - 407 (1980)

6. BUDDECKE: Grundriß der Biochemie.
5. Auflage, de Gruyter

7. CLOWICK and KAPLAN: Amylase, α and ß. Methods in Enzymologie.
Vol. 1, 149 - 158

8. DAVIS, J. E., BERK, S. TAKE and L. FRIDHANDLER: Electrophoretic characteristics of macroamylasemic serum.
Clin. Chim. Acta 35, 305 - 309 (1971)

9. FRIDHANDLER, L., J.E. BERK and D. WONG: Affinity characteristics of amylase-binding substances prepared from macroamylase complexes.
Clin. Chem. 20/1, 22 - 25 (1974)

10. FRIDHANDLER, L., J.E. BERK and K. MONTGOMERY: Nature of isoamylases released, by acidification from macroamylase complexes.
Clin. Chem. 20/1, 26 - 29 (1974)

11. HARADA, K., T. NAKAYAMA, M. KITABURA and T. SUGIMOTO: Immunological and electrophoretical approaches to macroamylase analysis.
Clin. Chim. Acta 59, 291 - 299 (1975)

12. HELTAT, A., J.E. BERK, L. FRIDHANDLER: The prevalence of macroamylasemia. A further study.
Am. J. Gastroent. 62, 54 - 58 (1973)

13. HOBBART, R., M. D. HANSEN, H. VANKLEY, W. A. KNIGHT: Macroamylasemia due to binding by protein.
Am. J. Med. 52, 712 - 720 (1972)

14. ILS, W.: Untersuchungen zum Bindungsverhalten und Enzymkinetik eines Amylase-Immunglobulinkomplexes.
Inaugural-Dissertation, Tübingen (1982)

15. KANNO, T. and SUDOK: Properties of amylase-linked immunglobulins.
Clin. Chim. Acta 76, 67 - 77 (1977)

16. KÖMPF, J., G. SIEBERT, H. RITTER: Human pancreatic amylase polymorphism: Formal genetics and populations genetics.
Hum. Genet. Vol. 51, 217 - 220 (1979)

17. LEVITT, M. D. and S. R. COOPERBAND: Hyperamylasemia from the binding of serum amylase by an 11S IgA globulin.
New Engl. J. Med. 27/9, 474 - 479 (1968)

18. LEVITT, M. D., E. J. GOETEL, S. R. COOPERBAND: Two forms of macroamylasemia.
Lancet 1, 957 - 958 (1968)

19. LEVITT, M. D., W. C. DUANE, S. R. COOPERBAND: Study fo macroamylase-complexes.
J. Lab. Clin. Med. 80, 414 - 422 (1972)

20. OTSUKI, M., S. SAEKI, H. YUU, M. MAEDA and S. BABA: Electrophoretic pattern of amylase isoenzymes in serum and urin of normal persons.
Clin. Chem. 22/4, 439 - 444 (1976)

21. SKUDE, G.: Electrophoretic separation, detection and variation of amylase isoenzymes.
Skand. J. clin. Lab. invest. 35, 41 - 47 (1975)

22. UEDA, M., E. BERK, L. FRIDHANDLER and D. JAMES: Ultracentrifugal characteristics of makro-amylasemic serum.
Clin. Chim. Acta 35, 299 - 304 (1971)

23. WARSHAW, Al., Kh. LEE: Macroamylasemia and other chronic nonspecific hyperamylasemias: chemical oddities or clinical entitities?
Am. J. Surg. 135, 488 - 494 (1978)

24. WILDING, P., W. T. COOKE and G. J. NICHOLSON: Globulinbound Amylase: A cause of persistently elevated levels in serum.
Am. J. of Internal Medicine 60, No. 9, 1053 - 1059 (June 1964)

Besonders danken möchte ich Herrn Professor Dr. med. M. Eggstein für die freundliche Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie den Herren Dr. med. J. Bohner und Dr. med. Dr. rer. nat. Stein für die Beratung bei der Durchführung der Versuche.

LEBENSLAUF

Am 6.2.1957 wurde ich, Klaus Wirth, als Sohn des Landwirtes Leo Wirth und seiner Frau Maria geb. Mandel, in Bad Mergentheim geboren.

Von 1964 bis 1967 besuchte ich die Volksschule in Landenbach. Danach trat ich in das Deutschorden-Gymnasium in Bad Mergentheim ein. Im Juni 1976 bestand ich das Abitur.

Im Oktober 1976 begann ich mein Medizinstudium in Ulm. Dort legte ich im August 1978 das Physikum ab. Anschließend wechselte ich an die Universität Tübingen. Im August 1981 legte ich die zweite ärztliche Prüfung ab. Mein praktisches Jahr verbrachte ich am Centre Hospitalier in Bayonne, einem Lehrkrankenhaus der Université Bordeaux II/Frankreich.

Am 25.April 1983 bestand ich den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung an der Universität Tübingen.